



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 13/00, 3/18		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/18017
			(43) Date de publication internationale: 28 novembre 1991 (28.11.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00400 (22) Date de dépôt international: 17 mai 1991 (17.05.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/06252 18 mai 1990 (18.05.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FONDATION NATIONALE DE TRANSFUSION SANGUINE [FR/FR]; 6, rue Alexandre Cabanel, F-75739 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CHTOUROU, Abdes-satar [TN/FR]; 2, square Francis-Carco, F-78190 S.-Quentin-en-Yvelines (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: METHOD FOR PREPARING HIGH-PURITY FACTOR VIII INCLUDING A RAPID IMMUNOADSORPTION STEP

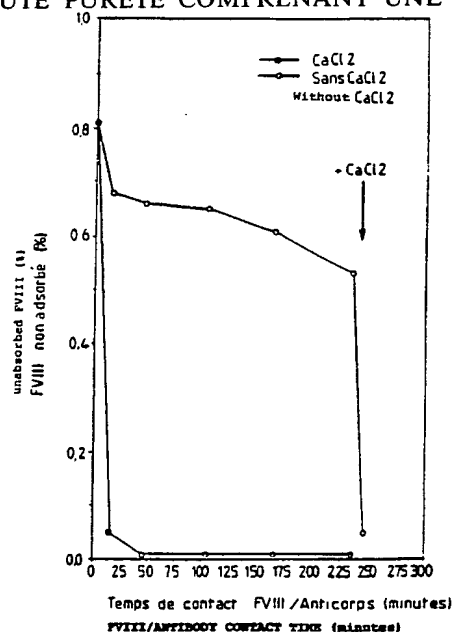
(54) Titre: PROCÉDE DE PREPARATION DE FACTEUR VIII DE TRES HAUTE PURETE COMPRENANT UNE ETAPE RAPIDE D'IMMUNOADSORPTION

(57) Abstract

A method for preparing high-purity Factor VIII from a complex aqueous mixture containing von Willebrand Factor-complexed Factor VIII, including immunoadsorption on an anti-Factor VIII monoclonal antibody. The method is characterized in that (a) a sufficient quantity of divalent ions is added to the complex aqueous mixture to ensure the dissociation of the Factor VIII/von Willebrand Factor complex; (b) the mixture containing Factor VIII is contacted with an immunoadsorbent consisting of an anti-Factor VIII monoclonal antibody which is immobilized on a rigid support by a covalent bond, said monoclonal antibody being so selected that it is directed against the light chain of the Factor VIII and can both inhibit the coagulative activity of the Factor VIII:C and bond the Factor VIII through strong hydrophobic interactions; and (c) the immunoadsorbent Factor VIII solution is eluted.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe, contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, procédé comprenant une étape d'immunoadsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisée en ce que: a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand; b) on met en contact le mélange contenant le Facteur VIII avec un immunoadsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant choisi tel qu'il soit dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ait à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes; c) on élu la solution de Facteur VIII de l'immunoadsorbant.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

I
PROCEDE DE PREPARATION DE FACTEUR VIII DE TRES HAUTE
PURETE COMPRENANT UNE ETAPE RAPIDE D'IMMUNOADSORPTION

L'invention a pour objet un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe comprenant du Facteur VIII.

5 De nombreux procédés ont déjà été décrits, visant à préparer des formes purifiées de Facteur VIII humain, en raison de l'importance industrielle de ce facteur pour les hémophiles et surtout, de la nécessité de disposer de Facteur VIII dépourvu de contaminants.

Suivant les utilisations envisagées, une pureté plus ou moins grande est requise, soit que le Facteur VIII soit destiné à être utilisé tel
10 quel dans une forme de pureté intermédiaire, soit qu'un état de pureté intermédiaire constitue justement un état transitoire avant la mise en oeuvre d'étapes ultérieures de purification plus poussée.

Pour préparer du Facteur VIII de très haute pureté, c'est-à-dire une pureté correspondant à une activité spécifique comprise entre environ
15 2000 et environ 6000 UI/mg de protéines, un certain nombre de procédés proposent de mettre en oeuvre, à partir de diverses sources de Facteur VIII, une étape d'immunoabsorption utilisant comme immunoabsorbant un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII.

Ainsi, la publication du brevet européen EP-A-0 286 323 décrit
20 un procédé de purification de Facteur VIII à partir d'un mélange de polypeptides qui comprend une étape d'immunopurification puis d'élution de la solution purifiée de Facteur VIII, suivie d'une étape de chromatographie. l'étape d'immunopurification consistant à mettre en contact ledit mélange avec un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, à laver le produit adsorbé
25 pour éliminer le Facteur von Willebrand, puis à éluer la solution de Facteur VIII pour désorber le Facteur VIII de l'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII.

En effet, dans tous les mélanges complexes contenant du Facteur VIII, tels que le plasma, le cryoprécipité remis en solution, les concentrés
30 de pureté intermédiaire ou encore les surnageants de culture qui contiennent du vWF destiné à stabiliser le Facteur VIII, le Facteur VIII se

trouve complexé à son transporteur naturel qui est le facteur von Willebrand (vWF). Ce complexe de haut poids moléculaire (20.10^6 D) est stable et ne se dissocie qu'en présence d'ions divalents tels que le Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , à des concentrations généralement supérieures à 0,25 M. Le

5 Facteur VIII est lui-même formé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère associées par l'intermédiaire d'un ion calcium.

Dans les conditions indiquées dans le document cité ci-dessus, on a constaté que les temps nécessaires pour mettre en contact la totalité du mélange complexe à purifier avec l'immunoabsorbant sont relativement

10 importants, de l'ordre de 15 à 30 heures. Ces durées sont probablement dues au fait que le Facteur VIII est mis en contact avec l'immunoabsorbant alors qu'il se trouve sous sa forme complexée au Facteur von Willebrand, ce qui tend à ralentir le processus. Ces conditions sont également souvent associées à un rendement assez faible, une partie non négligeable de

15 Facteur VIII restant fixée sur l'immunoabsorbant ou même étant très rapidement déstabilisée avant même de pouvoir se fixer.

L'invention se propose de fournir des moyens pour obtenir plus rapidement et éventuellement avec un meilleur rendement que par les procédés connus, un Facteur VIII de très haute pureté, à partir de sources

20 diverses de Facteur VIII.

L'invention se propose également de fournir un procédé de purification de Facteur VIII à partir d'un mélange aqueux complexe qui met en oeuvre une étape d'immunoabsorption, qui remédie aux inconvénients des procédés connus, et ce, quelle que soit la nature du mélange aqueux

25 complexe de départ.

L'inventeur a maintenant découvert que, de façon surprenante, ce but est atteint lorsque, préalablement à l'étape d'immunoabsorption avec un immunoabsorbant contenant un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, le mélange aqueux complexe est mis en présence d'ions divalents en

30 quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-vWF, l'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII étant par ailleurs choisi tel qu'il est dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et a à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par des fortes interactions hydrophobes.

C'est pourquoi l'invention a tout d'abord pour objet un procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, comprenant une étape d'immunoabsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisé en ce que :

5 a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand ;

10 b) on met en contact le mélange obtenu en a) avec un immunoabsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ayant à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par des fortes interactions hydrophobes ;

15 c) on élue de l'immunoabsorbant la solution de Facteur VIII obtenue.

Ainsi, il est du mérite de l'inventeur d'avoir établi que en choisissant correctement l'anticorps monoclonal, il était possible de mettre en oeuvre l'étape d'immunoabsorption dans des conditions de dissociation du complexe Facteur VIII-vWF et, par là même, de diminuer de façon considérable le temps de contact entre le mélange complexe à purifier et l'immunoabsorbant.

25 Par temps de contact, on entend le temps nécessaire à la mise en oeuvre de l'étape b), jusqu'à fixation de la totalité du Facteur VIII présent dans le mélange complexe, déterminé pour une quantité de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal allant de 200 à 600 Ui.

30 En se fixant sur la chaîne légère du Facteur VIII, l'anticorps monoclonal inhibe l'activité coagulante par blocage du site d'activation par la thrombine. Ceci conduit à une stabilisation du Facteur VIII et peut dans certains cas contribuer à une amélioration du rendement de l'étape d'immunoabsorption.

En outre, dans les conditions indiquées, on constate que seul le Facteur VIII se fixe sur l'anticorps monoclonal.

On constate que selon l'invention, il est possible d'avoir des temps de contact inférieurs à 1 heure et 30 minutes, et même parfois inférieurs à 1 heure.

Avantageusement, le procédé selon l'invention s'applique à différents mélanges aqueux complexes, notamment : le plasma, le cryoprécipité remis en solution, un concentré de pureté intermédiaire, un concentré de haute pureté, un surnageant de culture contenant du Facteur VIII recombinant.

Les concentrations d'ions divalents nécessaires pour obtenir la dissociation du complexe FVIII-vWF dépendent à la fois de la nature des ions utilisés ainsi que de la source de Facteur VIII utilisée comme mélange complexe de départ. En pratique, une concentration allant de 0,1 à 0,6 M, de préférence de 0,2 à 0,4 M convient particulièrement bien.

Le concept à la base de l'invention repose sur la découverte qu'avec des anticorps monoclonaux anti-Facteur VIII présentant certaines caractéristiques précises, il est possible d'éviter les inconvénients habituellement liés à une concentration élevée d'ions divalents dans le mélange à purifier.

Ces inconvénients sont illustrés par la figure 1 qui montre en effet qu'en présence de sels dissociants tels que CaCl_2 , MgCl_2 , on obtient une quantité plus faible de Facteur VIII après une heure d'incubation, que lorsque le cryoprécipité est tel quel (exemple témoin).

Tous les ions divalents ayant un effet de force ionique peuvent être utilisés. De façon non limitative, on peut citer les ions Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} . Cependant, on utilisera de préférence les ions Ca^{++} , plus particulièrement sous la forme CaCl_2 ou gluconate de calcium ou sels apparentés.

En ce qui concerne le mélange aqueux de départ, il est préférable qu'il soit autant que possible débarrassé de ses contaminants éventuels avant l'étape d'immunoabsorption. C'est pourquoi, on procède avantageusement à une inactivation virale. Une telle opération peut par exemple être
5 réalisée selon le procédé décrit dans les brevets US 4 481 189 et US 4 540 573 qui utilisent un mélange solvant et détergent tel que le mélange Tween 80/TnBP (Tri-n-butyl phosphate).

La nature et les quantités de solvant et détergent à utiliser en pratique dépendent à la fois de la nature du mélange aqueux complexe et
10 de la nature des solvants et détergents.

D'une manière générale, il est avantageux de procéder à une inactivation virale de tous les produits qui interviennent dans la mise en oeuvre du procédé, c'est-à-dire notamment du support d'immobilisation des anticorps monoclonaux, comme des anticorps monoclonaux eux-mêmes.

15 Pour préparer l'immunoabsorbant utilisable selon l'invention, on prépare d'une part un support d'immobilisation des anticorps monoclonaux et d'autre part, les anticorps monoclonaux eux-mêmes.

Différents supports tels que les billes d'agarose, d'acrylamide, de silice, de polymères synthétiques ou encore à base de mélange de ces
20 substances peuvent être activés avec différents types de réactifs chimiques. On utilisera de préférence des gels de très forte porosité, notamment des gels d'acrylamide. On peut citer en particulier le gel formé d'un mélange de dextran et d'acrylamide Séphacryl S1000, commercialisé par la société Pharmacia, que l'on active avec de la benzoquinone selon une technique
25 classique décrite par Brandt et al, Bioch. Biophys. Acta, 1975, 386, 192-202.

En général, après élimination par différents lavages des groupements non réactifs, le gel activé est mis en contact avec la solution d'anticorps monoclonal. Afin de minimiser les fuites d'anticorps, il est préférable que le taux d'anticorps à immobiliser ne soit pas trop élevé.
30 C'est pourquoi, la concentration d'anticorps monoclonal est de préférence de 0,1 à 5 mg/ml de gel, plus préférentiellement encore de 0,3 à 1 mg/ml.

Ensuite, après une certaine durée de réaction de l'ordre de 24 heures, les protéines en excès sont éliminées par lavage. Les sites activés restants sont bloqués par addition de tampons, par exemple des tampons contenant de la glycine, de l'éthanolamine ou encore du Tris.

5 Pour préparer les anticorps monoclonaux (ACM), les cellules productrices de l'anticorps sont cultivées, soit in vivo chez des souris Balb/C, soit de préférence in vitro dans un cytotecteur dans un milieu approprié. Les ACM sont donc purifiés à partir soit de liquides d'ascites, soit de surnageants de culture. On utilisera de préférence des ACM tels que
10 décrits dans la publication de M. P. Croissant et al, Thrombosis and Haemostasis 56(3) 271-276, 1986, c'est-à-dire qui fixent 100 % de Facteur VIII en présence de CaCl_2 à une concentration de 0,25 M et plus particulièrement encore l'ACM désigné sous l'appellation 463A8 dans cette publication.

15 Enfin, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, cette étape d'immunopurification est suivie d'une étape de chromatographie d'affinité, de préférence sur un échangeur d'ions anioniques. Cette étape de chromatographie vise à la fois à concentrer le Facteur VIII et à éliminer les anticorps monoclonaux d'origine murine qui auraient pu
20 contaminer le produit.

 L'invention a plus particulièrement pour objet le procédé tel que décrit précédemment, dans lequel en tant que mélange complexe de départ, on utilise le plasma humain. Dans ces conditions, préalablement à l'étape b), on ajuste le pH aux environs de 6,5 à 6,8. Dans ce cas également, il sera
25 préférable, lorsqu'on effectue une inactivation virale, d'utiliser des quantités plus importantes du mélange d'inactivation virale approprié que celles utilisées pour les autres mélanges complexes.

 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description détaillée suivante de différents modes de
30 réalisation de l'invention.

Les figures 1 à 4 illustrent l'invention.

La figure 1 représente l'évolution de la quantité de Facteur VIII présent dans un cryoprécipité en fonction du temps d'incubation de ce cryoprécipité avec différents ions monovalents et divalents, le témoin étant le cryoprécipité.

La figure 2 représente l'évolution de la quantité de Facteur VIII non adsorbé sur une colonne d'immunoaffinité comprenant les ACM anti-Facteur VIII en fonction du temps de contact entre le Facteur VIII et l'ACM considéré, dans des conditions dissociantes et non dissociantes, le mélange complexe de départ étant un concentré de pureté intermédiaire inactivé viralement.

La figure 3 représente la même évolution que celle présentée à la figure 2, le mélange complexe de départ étant le plasma.

La figure 4 représente la même évolution que celle représentée à la figure 3, mais en comparant l'effet des ions divalents et monovalents, le mélange complexe de départ étant un concentré de pureté intermédiaire.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention peut être mise en oeuvre à partir de diverses sources de Facteur VIII, qui peuvent être préparées de la façon suivante avant l'étape d'immunoadsorption.

a) plasma

Le plasma est décongelé rapidement. Après addition des ions divalents et éventuellement d'un mélange inactivation virale, il est mis en contact avec l'immunoadsorbant.

b) cryoprécipité

Pour préparer un cryoprécipité, on centrifuge du sang humain collecté en présence de citrate de sodium, afin d'éliminer la fraction cellulaire. Le plasma obtenu est congelé à -40°C dans des poches plastiques. On procède ensuite en trois étapes successives pour obtenir le cryoprécipité :

- Prédécongélation du plasma : il est réchauffé progressivement de manière à ce que sa température passe de -40°C à -11°C en 8 heures :

- Décongélation du plasma : on élimine les poches plastiques puis on place le plasma congelé dans un broyeur pendant environ 2 minutes. On maintient la température de la suspension obtenue entre 0 et 0,5°C ;

5 - Séparation du cryoprécipité : on centrifuge la suspension à une température comprise entre 1 et 4°C.

 Ensuite, il est généralement resuspendu dans un tampon tel que Tris-HCl 0,025 M pH 7. Après dissolution, 98 g (3% partie/volume) d'Al(OH)₃ sont ajoutés par kg de cryoprécipité de départ. Après 10 mn d'agitation, le mélange est centrifugé à 3000 g. Le surnageant est
10 éventuellement inactivé viralement puis les ions dissociants sont ajoutés et la solution est mise en contact avec l'immunoabsorbant.

 c) Facteur VIII de pureté intermédiaire

 Le cryoprécipité est remis en suspension dans un tampon puis les protéines contaminantes sont éliminées et le Facteur VIII peut être
15 récupéré sous forme d'une solution concentrée ayant une activité spécifique aux environs de 1 UI/mg. L'inactivation virale et la dissociation du Facteur VIII peuvent être réalisées comme pour la préparation du cryoprécipité.

 Pour l'ensemble des exemples de réalisation qui vont suivre, la préparation de l'immunoabsorbant se fait dans les conditions indiquées
20 ci-après :

Obtention des anticorps monoclonaux

 1° - Immunisation

 Une souris Balb/c est immunisée de la façon suivante, avec un Facteur VIII purifié de la façon décrite dans la publication M.P. Croissant
25 et al, déjà citée.

 Semaines 1 et 4 : Injection sous cutanée de 150 µl d'Al(OH)₃ contenant 50 UI de Facteur VIII ;

 Semaine 8 : Injection par voie intraveineuse de 50 UI de Facteur VIII.

30 3 jours après la dernière injection, l'animal est sacrifié pour le prélèvement de la rate.

 2° - Fusion et production d'hybridomes murins

Les splénocytes murins sont fusionnés avec des cellules myélomateuses NS1 dans un rapport 10:1.

Les cellules sont par la suite sélectionnées sur un milieu HAT puis testées quant à leur aptitude à sécréter des anticorps répondant à ces deux critères :

- Aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C
- et - Aptitude à lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes.

Les cellules répondants à ces critères ont été clonées par dilution limite.

582 hybrides ont été ainsi testées. 20 % des surnageants cellulaires contiennent des anticorps anti-Facteur von Willebrand et 2,5 % des anticorps anti-Facteur VIII:C. Parmi les lignées stables après clonage, et sécrétant un anticorps anti-Facteur VIII:C la lignée CAG-1 463A8 a été sélectionnée (M.P. Croissant et al, déjà citée).

3° - Préparation des anticorps monoclonaux

Les cellules productrices sont cultivées in vivo dans un cytotoculteur dans un milieu approprié.

Le protocole de purification suivant peut être appliqué.

1. Séparation des cellules et débris cellulaires par une filtration tangentielle sur 0,45 puis 0,22 μ ;

2. Concentration 10 fois du surnageant de culture par ultrafiltration.

3. Chromatographie sur protéine A Sépharose FF commercialisée par la société Pharmacia.

4. Ajustement du pH et de la résistivité de l'éluat de la protéine A Sépharose.

5. Chromatographie d'échange d'ions anioniques par exemple sur Q Sépharose FF.

6. Dialyse et ultrafiltration pour ajuster le taux d'anticorps à la concentration voulue.

7. Inactivation virale de la solution d'anticorps par pasteurisation.

8. Congélation à -80°C jusqu'à libération du lot après contrôle.

5 Immobilisation de l'anticorps monoclonal

Après lavage avec des tampons de pH extrême (pH 4 et pH 9) et des agents chaotropes, c'est-à-dire des agents susceptibles de casser les interactions hydrophobes, afin d'éliminer les molécules fixées de façon aspécifique, le gel d'immunoaffinité est stocké à 4°C en présence d'agents empêchant la croissance des microorganismes.

De préférence, avant son utilisation, le gel est mis à incuber pendant 24 heures en présence d'un mélange d'inactivation virale tel que cité précédemment.

15 Tampons utilisés dans les exemples :

Immunoaffinité :

- tampon d'équilibrage (tampon A) :

Imidazole-HCl 20 mM, pH 6,8 ; NaCl 150 mM,

- tampon d'élution (tampon B) :

20 Imidazole 10 mM pH 7, NaCl 0,075 M, éthylène glycol 50 %, Tween 80 1 %. L'ajout d'un détergent dans le tampon d'élution est particulièrement avantageux et il permet d'améliorer encore le rendement de l'étape.

25 Chromatographie par échange d'ions

- tampon d'équilibrage (tampon C) :

Tris-HCl 20mM, pH7, NaCl 0,27 M,

- tampon d'élution (tampon D),

glycine 0,1 M, lysine 0,03 M, NaCl 0,05 M, CaCl₂ 0,3 M, pH7

- 30 - tampon de dialyse (tampon E) :

glycine 0,1M, lysine 0,03 M, NaCl 0,2M, CaCl₂ 1mM. pH7.

Exemple de mise en oeuvre du procédé à partir d'un concentré de pureté intermédiaire

4 kg de cryoprécipité, obtenus à partir de 524 l de plasma ont été remis en solution dans un tampon Tris 20 mM pH 7. Le pH de la solution est ensuite ajusté à pH 7,1 et les principaux contaminants protéiques tels que fibronectine, fibrinogène, IgG sont éliminés en deux temps : une première précipitation à l'héparine obtenue par ajout de 24 unités d'héparine par ml de solution à 20°C, et le précipité formé est éliminé par centrifugation ; ensuite, on ajoute 22 g de gel d'hydroxyde d'aluminium par litre de solution, puis on abaisse le pH à 6,00. Le précipité formé est éliminé par centrifugation.

On ajoute du CaCl_2 jusqu'à atteindre une concentration finale de 0.25M puis on ajoute un mélange d'inactivation virale à une concentration de 1% de Tween 80 et 0,3 % de TnBP, puis on incube pendant 6 heures à 24°C.

La solution est alors prête pour l'étape d'immunoabsorption.

L'immunoabsorption est ensuite réalisée de la façon suivante :

Pour préparer la colonne, on la remplit avec 1,2 l du gel d'immunoaffinité (le Séphacryl S1000 activé à la benzoquinone) où se trouve fixé l'anticorps monoclonal 463A8 à une concentration de 0,5 mg/ml de gel en présence du mélange d'inactivation virale déjà décrit. La colonne est conservée ainsi 24 heures à 20°C, puis transférée dans une zone hors virus (ZHV) où le gel est équilibré par 10 volumes colonne de tampon A. 23,5 l de la solution de Facteur VIII prépurifiée, obtenue précédemment sont injectés dans la colonne à un débit de 16 volumes colonne/heure.

Les protéines non retenues sont éliminées par lavage de l'immunoabsorbant avec 10 volumes colonne de tampon d'équilibrage A avec un débit de 16 volumes colonne/heure.

Le Facteur VIII est élué avec 6,5 volume colonne d'un tampon B avec un débit de 8 volumes colonne/heure.

L'étape d'immunopurification est suivie d'une étape de chromatographie d'échange d'ions, selon laquelle 900 ml de Q Sépharose FF (gel commercialisé par Pharmacia) sont placés dans une colonne en présence d'éthanol à 20 % puis lavés successivement avec 2 l NaOH 0,5 N,
5 5 l d'eau distillée, 3 l NaCl 2M, 5 l d'eau distillée, puis enfin, équilibrés avec 7 l du tampon C. L'éluat récupéré de la colonne d'immunoaffinité est alors injecté à un débit de 12 l/h. A la fin de l'injection, le gel est lavé avec 9 l de tampon d'équilibrage A. Le Facteur VIII est élué avec 3 l de tampon d'élution D à un débit de 6 l/h. Ensuite, pour préparer du Facteur VIII
10 VIII prêt à la commercialisation, on dialyse la solution de Facteur VIII obtenu après addition d'albumine contre 6 volumes d'un tampon E à un débit de 15 l/h. La solution est ensuite filtrée stérilement, répartie en dose unitaire puis lyophilisée.

Le temps nécessaire pour charger la solution de Facteur VIII
15 (324.5 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal) dans la colonne d'immunoaffinité est de 1 h 20 mn, le lavage dure 45 mn et l'élution dure 58 mn.

Le tableau suivant représente les différentes caractéristiques du procédé selon l'invention. Les résultats comportent à la fois le rendement
20 de chaque étape du procédé et le rendement global du procédé.

ETAPE	FVIII:Unités totales (U/ml)	Rendement étape (%)	Rendement procédé (%)	Activité spécifique
Plasma humain	524 600*	100	---	0,016
Cryoprécipité	244 000	46,5	100	0,4
Concentré de pureté intermédiaire	194 700	79,8	79,8	1
(inactivé viralement par un mélange solvant/détergent)				
Immunopurification	169 500	87	69,5	---
Echange d'ions	152 500	89,9	62,5	2400
Dialyse	144 800	94,9	59,3	9,6

* Plasma estimé arbitrairement à 1 U/ml non dosé.

Un exemple comparatif a été réalisé dans les conditions indiquées dans le document EP-A-0 286 323, c'est-à-dire que l'immunopurification ne comporte pas l'étape a) mais comporte après l'étape b) une étape supplémentaire pour éliminer le Facteur von Willebrand. Dans ces conditions, le temps nécessaire pour charger la solution de Facteur VIII dans la colonne est de 27 heures, le lavage comportant la nécessité d'éliminer le Facteur von Willebrand dure 10 heures et l'élution dure 3 h 20 minutes. Le gain de temps obtenu selon l'invention est donc significatif.

Cet exemple est par ailleurs illustré par la figure 2 qui montre bien qu'après 50 mn de contact selon l'invention, 10 % environ de Facteur VIII seulement n'est pas adsorbé, alors que ce pourcentage s'élève à près de 65 % lorsque le Facteur VIII n'a pas été préalablement dissocié.

La figure 4 illustre par ailleurs l'intérêt de l'utilisation d'ions divalents plutôt que d'autres ions, en particulier des ions monovalents tels que NaCl. En effet, même si, d'après la figure 1, NaCl a tendance à déstabiliser moins rapidement le Facteur VIII que CaCl_2 , le Facteur VIII est adsorbé beaucoup plus rapidement lorsqu'il a été dissocié avec des ions divalents.

Exemple de purification du Facteur VIII à partir du plasma

a) Exemple comparatif, dans des conditions non dissociantes.

1000 ml de plasma inactivé viralement (Tween 80 2%, TnBP 0,6 %) pH 6,8 sont mis à incuber avec 10 ml de gel d'immunoaffinité pendant 16 heures, soit 200 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal, l'ACM anti-Facteur VIII étant l'ACM463A8, à une concentration de 0,5 mg/ml de gel. Cette durée est celle nécessaire pour l'adsorption de 100 % de Facteur VIII présent dans le milieu à + 4°C. Le gel est ensuite transféré en colonne, lavé avec un tampon imidazole 20 mM, pH 7, NaCl 0,15 M, jusqu'à élimination des protéines contaminantes (suivie par densitométrie jusqu'à annulation de la densité optique à 280 nm).

Ensuite, le gel est lavé avec un tampon imidazole 20 mM, pH 6,8, CaCl_2 0,25 M, pour éluer le vWF. Le Facteur VIII est élué ultérieurement avec un tampon imidazole 10 mM pH7 NaCl 0,075 M éthylène glycol 50 % Tween 80 1 %. Le rendement en Facteur VIII est de 24 %.

5

b) Selon l'invention

A 1000 ml de plasma, on ajoute CaCl_2 à une concentration finale de 0,113 M, on inactive viralemment le plasma avec un mélange de 2 % de Tween 80 et de 0,6 % de TnBP, et on ajuste le pH à 6,8.

10

On effectue l'immunoabsorption en colonne avec un débit de 120 ml/cm²/h, dans une colonne de 5 cm de diamètre, ce qui correspond à un débit volumique de 2,4 l/heure et à un temps de charge de 25 mn pour 1 l de plasma. Le rendement en Facteur VIII est de 61 %.

15

Le même essai répété 10 fois donne à chaque fois des rendements à peu près constants, aussi bien pour l'exemple comparatif que pour l'exemple conforme à l'invention (respectivement $24,3 \pm 2,3$ % et $61,1 \pm 6,3$ %).

20

La figure 3 illustre bien cet aspect de l'invention appliqué au plasma. Après 25 mn pratiquement tout le Facteur VIII est adsorbé selon l'invention, tandis que près de 70 % ne l'est pas selon l'exemple comparatif.

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de Facteur VIII de très haute pureté à partir d'un mélange aqueux complexe, contenant du Facteur VIII complexé au Facteur von Willebrand, procédé comprenant une étape d'immuno-adsorption sur un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, caractérisé en ce que :

a) on ajoute audit mélange aqueux complexe des ions divalents en quantité suffisante pour obtenir la dissociation du complexe Facteur VIII-Facteur von Willebrand ;

b) on met en contact le mélange obtenu en a) avec un immunoadsorbant constitué d'un anticorps monoclonal anti-Facteur VIII immobilisé par liaison covalente sur un support rigide, ledit anticorps monoclonal étant dirigé contre la chaîne légère du Facteur VIII et ayant à la fois une aptitude à inhiber l'activité coagulante du Facteur VIII:C et à lier le Facteur VIII par de fortes interactions hydrophobes ;

c) on élue la solution de Facteur VIII de l'immunoadsorbant ;

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape b) est poursuivie jusqu'à adsorption de la totalité du Facteur VIII présent dans le mélange complexe.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que, pour 200 à 600 UI de Facteur VIII par mg d'anticorps monoclonal, le temps de contact est inférieure à 1 heure 30 minutes, de préférence inférieur à 1 heure.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit mélange est choisi parmi le plasma, le cryoprécipité remis en solution, un concentré de pureté intermédiaire, un concentré de haute pureté, un surnageant de culture contenant du Facteur VIII recombinant.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les ions divalents sont ajoutés à des concentrations allant de 0,1 à 0,6 M, de préférence de 0,2 à 0,4 M.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les ions divalents ajoutés à l'étape a) sont choisis parmi Mg^{++} , Mn^{++} , Ba^{++} , Ca^{++} .

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les ions divalents sont les ions Ca^{++} .

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit mélange est inactivé viralement.

5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit support et/ou ledit anticorps monoclonal sont inactivés viralement.

10 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le support de l'étape b) comprend un gel de très forte porosité.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gel d'acrylamide.

15 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration d'anticorps monoclonal est de 0,1 à 5 mg/ml, de préférence de 0,3 à 1 mg/ml.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le mélange complexe est le plasma humain et préalablement à l'étape b), on ajuste le pH aux environs de 6,5 à 6,8.

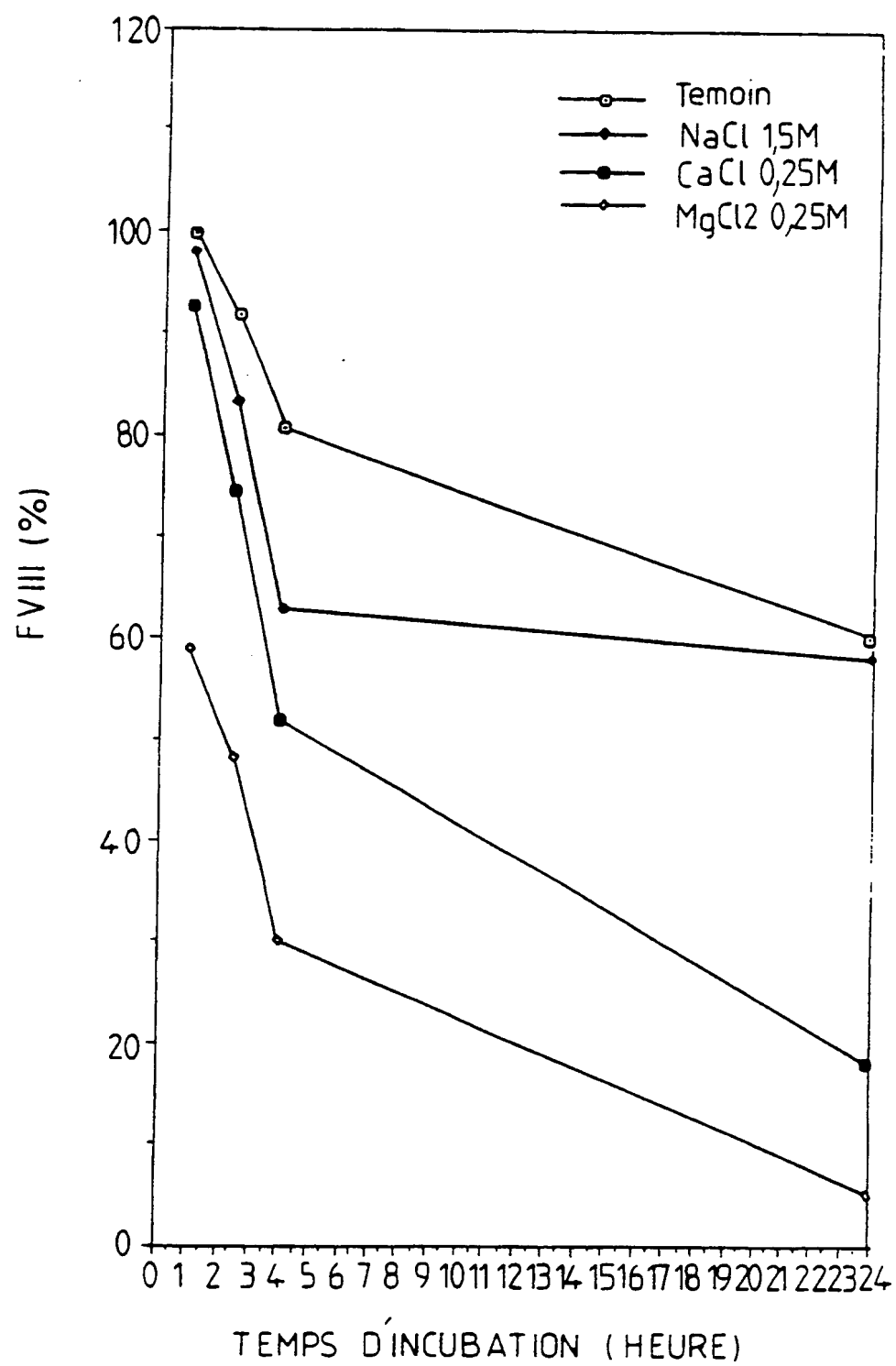
20 14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que en tant qu'anticorps monoclonal anti-Facteur VIII, on utilise un anticorps monoclonal qui fixe 100 % de Facteur VIII, en présence de CaCl_2 à une concentration de 0,25 M.

25 15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que à l'étape c) on utilise un tampon d'élution qui comprend un détergent.

16. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend une étape d) selon laquelle on chromatographie par échange d'ions la solution de Facteur VIII élue à l'étape c).

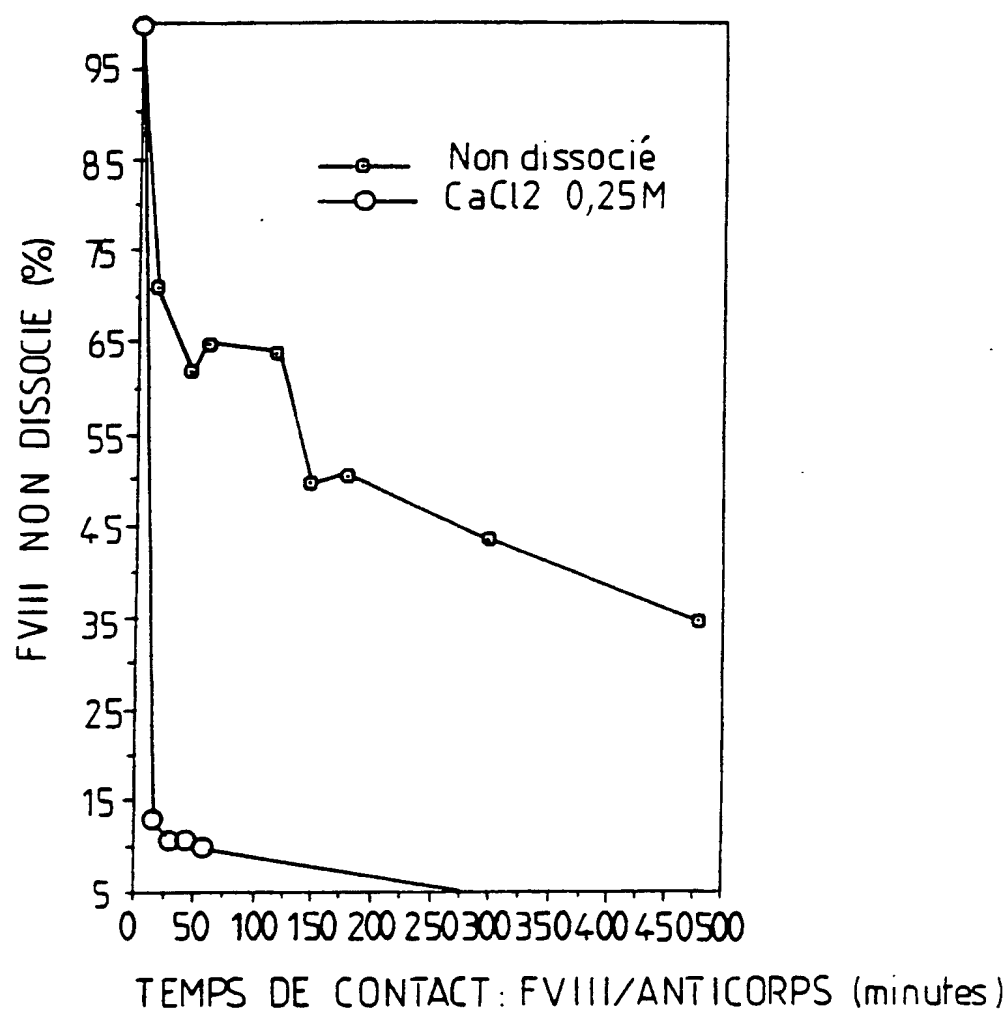
1/4

FIG.1



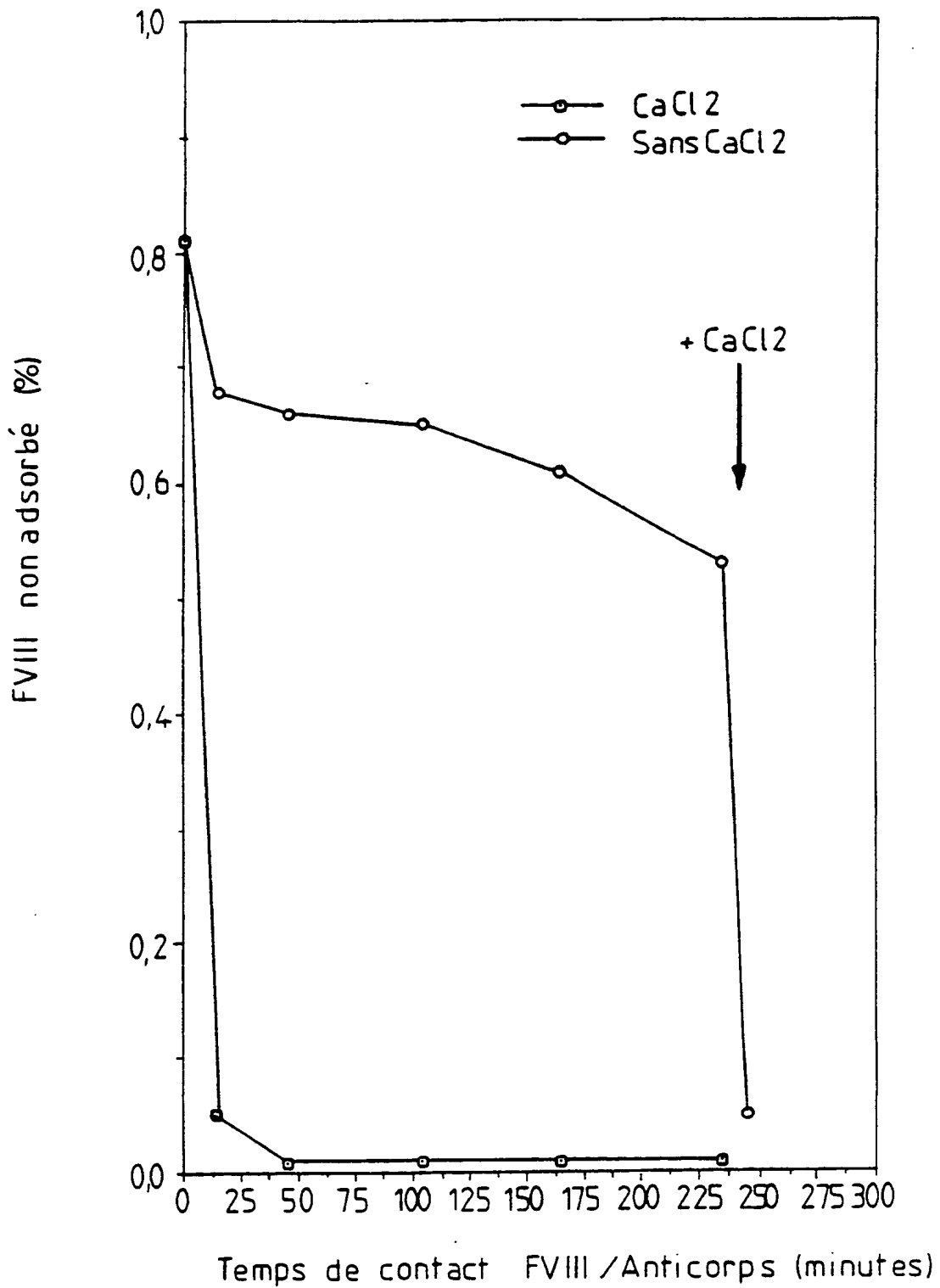
2/4

FIG:2



3/4

FIG. 3



4/4

IMMUNOAFFINITE
CINETIQUE DE FIXATION DU FVIII EN
CONDITION DISSOCIANTE ET NON DISSOCIANTE

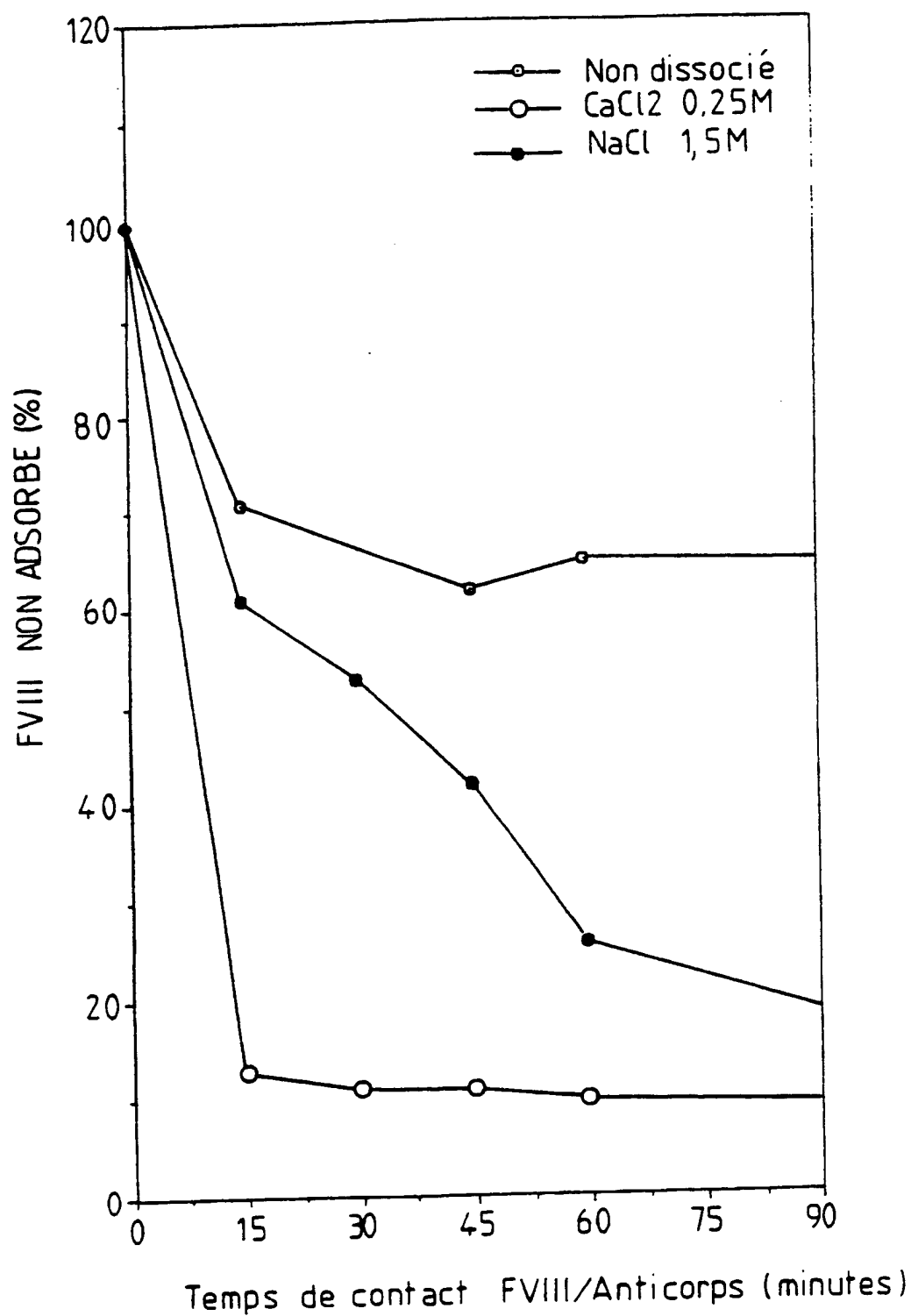


FIG.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00400

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5	C07K 13/00	C07K 3/18
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.CL.5	C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	EP, A, 0286323 (BAXTER) 12 October 1988 see the whole document (cited in the application) ---	1-16
Y	EP, A, 0123945 (SCRIPPS) 7 November 1984 see page 11 ---	1-16
Y	EP, A, 0152746 (CHIRON) 28 August 1985, see the whole document -----	1-16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
28 August 1991 (28.08.91)	23 September 1991 (23.09.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100400

SA 48065

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 17/09/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0286323	12-10-88	JP-A- 1013099	17-01-89

EP-A- 0123945	07-11-84	AU-B- 572128	05-05-88
		AU-A- 2627284	04-10-84
		JP-A- 59184130	19-10-84
		US-A- 4886876	12-12-89
		US-A- 4657894	14-04-87
		US-A- 4649132	10-03-87
		US-A- 4857635	15-08-89

EP-A- 0152746	28-08-85	US-A- 5004804	02-04-91
		US-A- 4716117	29-12-87
		EP-A- 0150735	07-08-85
		EP-A- 0432134	12-06-91
		JP-A- 60185723	21-09-85
		JP-A- 60210981	23-10-85

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale

PCT/FR 91/00400

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION Plusieurs symboles de classification sont applicables, les (voir tous) ?		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
Int.CI.5 C 07 K 13/00 C 07 K 3/18		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
Int.CI.5	C 07 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	EP,A,0286323 (BAXTER) 12 octobre 1988, voir le document en entier (cité dans la demande) ---	1-16
Y	EP,A,0123945 (SCRIPPS) 7 novembre 1984, voir page 11 ---	1-16
Y	EP,A,0152746 (CHIRON) 28 août 1985, voir le document en entier -----	1-16
<p>° Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
28-08-1991	23.09.91	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Mme Dagmar FRANK	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100400
SA 48065

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17/09/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0286323	12-10-88	JP-A- 1013099	17-01-89

EP-A- 0123945	07-11-84	AU-B- 572128	05-05-88
		AU-A- 2627284	04-10-84
		JP-A- 59184130	19-10-84
		US-A- 4886876	12-12-89
		US-A- 4657894	14-04-87
		US-A- 4649132	10-03-87
		US-A- 4857635	15-08-89

EP-A- 0152746	28-08-85	US-A- 5004804	02-04-91
		US-A- 4716117	29-12-87
		EP-A- 0150735	07-08-85
		EP-A- 0432134	12-06-91
		JP-A- 60185723	21-09-85
		JP-A- 60210981	23-10-85

EPO FORM P0472

